



Agronomía Mesoamericana
ISSN: 2215-3608
pccmca@gmail.com
Universidad de Costa Rica
Costa Rica

Compilación de oligonucleótidos para la detección y clasificación de fitoplasmas¹

Araujo-Ruiz, Karina; Cambrón-Crisantos, José Manuel; Cruz-Jaramillo, José Luis; Ronces-Frutos, Liliana Elizabeth; López-Buenfil, José Abel; Torres-Martínez, José Gustavo

Compilación de oligonucleótidos para la detección y clasificación de fitoplasmas¹

Agronomía Mesoamericana, vol. 29, núm. 3, 2018

Universidad de Costa Rica, Costa Rica

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43756297014>

DOI: <https://doi.org/10.15517/ma.v29i3.29832>

Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional. Basada en una obra en <http://www.revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso>. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden encontrarse en pccmca@gmail.com.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional.

Compilación de oligonucleótidos para la detección y clasificación de fitoplasmas¹

Compilation of primers for the detection and classification of phytoplasmas

Karina Araujo-Ruiz
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, México
karina.araujo@senasica.gob.mx

DOI: <https://doi.org/10.15517/ma.v29i3.29832>
Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43756297014>

José Manuel Cambrón-Crisantos
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, México
dgs.v.iica061@senasica.gob.mx

José Luis Cruz-Jaramillo
Instituto Politécnico Nacional, México
lcruz@cinvestav.mx

Liliana Elizabeth Ronces-Frutos
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, México
leliz.ron.fru@gmail.com

José Abel López-Buenfil
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, México
abel.lopez@senasica.gob.mx

José Gustavo Torres-Martínez
Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Moldavia
gustavo.torres@senasica.gob.mx

Recepción: 27 Julio 2017
Aprobación: 09 Enero 2018

RESUMEN:

Los fitoplasmas son procariontes fitopatógenos de gran importancia, debido a que han sido relacionados con numerosas enfermedades alrededor del mundo. El objetivo de esta investigación fue dar a conocer los avances que se tienen sobre las características generales, el tamaño y composición del genoma y los genes y/o regiones empleados como marcadores moleculares para la identificación y caracterización de los fitoplasmas. Entre sus principales hospederos se encuentran los árboles frutales y maderables, hortalizas, flores de corte y malezas, en los cuales generan alteraciones en el equilibrio hormonal, produciendo síntomas como filodias y virescencias. Debido a que no ha sido posible su aislamiento *in vitro*, estos se han identificado, principalmente, mediante técnicas moleculares. Aunado a esto, el uso de la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) ha permitido conocer el genoma completo de algunos fitoplasmas, así como las regiones y genes que lo constituyen. En la presente revisión bibliográfica, se recopila la información generada a partir de las técnicas moleculares y la secuenciación NGS, así como los oligonucleótidos reportados para identificar algunos grupos de fitoplasmas.

PALABRAS CLAVE: Mollicute, *Candidatus*, genoma, PCR.

ABSTRACT:

Phytoplasmas are phytopathogenic prokaryotes of great importance because they have been linked to numerous diseases around the world. The aim of these research was to present the general characteristics, the size and composition of the genome and the genes and/or regions used as molecular markers for the identification and characterization of phytoplasmas. Among its main hosts are

NOTAS DE AUTOR

karina.araujo@senasica.gob.mx

fruit and wood trees, vegetables, cut flowers and weeds, which generate alterations in the hormonal balance producing symptoms such as philodias and virescence. Because its isolation *in vitro* has not been possible, the detection and characterization has been carried out, mainly, with molecular techniques. In addition, the use of New Generation Sequencing (NGS) has allowed to know the complete genome of some phytoplasmas, as well as the regions and genes that constitute it. In the present bibliographic review, the information generated from the molecular techniques and NGS sequencing is compiled, as well as the primers reported to identify some groups of phytoplasmas.

KEYWORDS: Mollicute, *Candidatus*, genome, PCR.

INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas son bacterias endófitas con formas pleomórficas, que poseen un tamaño variable desde 50 hasta 1000 nm de diámetro. Se ha sugerido que su propagación es llevada a cabo mediante fisión binaria, siendo capaces de una replicación autónoma (Doi et al., 1967; Oshima et al., 2004).

Inicialmente los fitoplasmas fueron catalogados como organismos cercanamente relacionados a los micoplasmas, debido a la similitud morfológica con los micoplasmas que infectan animales y a su sensibilidad a los antibióticos de la familia de las Tetraciclinas (Ishii et al., 1967). Sin embargo, difieren sustancialmente de ellos, debido a caracteres morfológicos como la ausencia de pared celular y a sus características moleculares como homología (97,5%) con el gen ribosomal 16S (16Sr) y bajo contenido de Guanina (G) y Citosina (C). Taxonómicamente se encuentran dentro de la clase Mollicutes, donde también se encuentran los micoplasmas, ureplasmas, spiroplasmas y acholeplasmas (Razin et al., 1998). Estos procariontes han sido agrupados dentro de la categoría *Candidatus*, donde son referenciados todos aquellos organismos que no han podido ser cultivados en medios artificiales (*in vitro*) (Reveles-Torres et al., 2014). Por esta razón, a partir de 2004 el nombre científico para referirse a los fitoplasmas quedó establecido como “*Candidatus* Phytoplasma” (The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team – Phytoplasma taxonomy group, 2004).

El rango de hospedantes de los fitoplasmas incluye por lo menos 1000 especies de plantas alrededor del mundo, en su mayoría dicotiledóneas (Seemüller et al., 2002), incluyendo hortalizas, árboles frutales y maderables, flores de corte y malezas (Lee et al., 2000; Hogenhout y Music, 2010; Tan et al., 2016). Estos fitopatógenos se caracterizan por colonizar el floema de las plantas, donde residen y se multiplican, alterando el balance de fitohormonas. Como resultado de estas alteraciones, se observan patologías como enanismos, amarillamientos, proliferación de yemas, ramas, hojas y raíz (patología conocida como “escoba de bruja”), virescencia (pétalos florales verdes) y filodias (conversión de flores a hojas). Además, producen elongación de hojas, esterilidad de flores, elongación anormal de entrenudos, brotes delgados y acucharamiento de hojas. Adicionalmente, los fitoplasmas están asociados con muchos otros síntomas inespecíficos; sin embargo, estos pueden ser resultado de la tensión a la que se somete la planta huésped por la infección (Lee et al., 1998a; Bertaccini, 2007).

Una de las enfermedades causadas por los fitoplasmas con mayor impacto económico es el “Amarillamiento letal del Cocotero”, la cual es ocasionada por fitoplasmas del grupo 16SrIV. Esta enfermedad ha causado grandes pérdidas económicas y, actualmente se encuentra distribuida en el continente americano, africano y asiático (Mpunami et al., 1999; Harrison et al., 2002; Harrison et al., 2014). Por otra parte, se han registrado pérdidas económicas en el cultivo de papa a causa del fitoplasma ‘*Ca. Phytoplasma trifolii*’ [16SrVI-A], que ocasiona síntomas de escobas de bruja en la raíz, impidiendo el flujo de nutrientes y el correcto desarrollo del tubérculo (Bertaccini y Duduk, 2009). Los cultivos de maíz de las zonas del centro y sur de América reportaron bajo rendimiento de la planta, debido al enanismo arbustivo y al amarillamiento, producidos por el fitoplasma ‘*Ca. Phytoplasma asteris*’ [16SrI-B] (Bedendo et al., 2000; Bertaccini y Duduk, 2009).

Los fitoplasmas son simbioses en plantas y en algunos insectos, principalmente del orden Hemiptera como los de la familia Fulgoridae, Cicadellidae, Delphacidae, Derbidae y Flatidae comúnmente llamados “chicharritas”, aunque algunos psílidos (Familia Psyllidae) y saltamontes (Familia Acrididae) también se comportan como vectores después de alimentarse del floema de las plantas infectadas (Bertaccini, 2007).

Debido a la incapacidad de cultivar a los fitoplasmas de manera *in vitro*, los caracteres fenotípicos para su identificación y clasificación han sido difíciles de determinar. Tradicionalmente, el diagnóstico de fitoplasmas se hacía a partir de la caracterización de los síntomas y la observación mediante microscopía electrónica (Doi et al., 1967). Sin embargo, con la implementación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por las siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*), la PCR anidada, así como los perfiles de Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP por las siglas en inglés de *Restriction Fragment Length Polymorphism*) en el gen ribosomal 16S, se estableció un sistema de clasificación a partir de la generación de patrones polimórficos, para diferenciar a los fitoplasmas en grupos y subgrupos (Lee et al., 1998b).

Actualmente, se han identificado nuevos fitoplasmas que no cumplen con el criterio de agrupación propuesto por Lee et al. (1998b), debido a variaciones heterogéneas en sus secuencias y a la generación de nuevos perfiles polimórficos. No obstante, se han propuesto nuevos criterios de clasificación con base en la información disponible de las regiones y genes alternativos al marcador 16SrRNA, lo que ha permitido ubicar regiones específicas para el diseño de oligonucleótidos que coadyuvan en su identificación y clasificación (Hodgetts et al., 2008). La caracterización del genoma de varios fitoplasmas a través de la Secuenciación de Nueva Generación (NGS, por las siglas en inglés de *New Generation Sequencing*) ha permitido tener un panorama más amplio de su composición y conocer las relaciones evolutivas entre grupos de fitoplasmas y clases de Mollicutes (Bai et al., 2004; Gasparich, 2010).

El objetivo de esta investigación fue dar a conocer los avances que se tienen sobre las características generales, el tamaño y composición del genoma y los genes y/o regiones empleados como marcadores moleculares para la identificación y caracterización de los fitoplasmas.

GENOMA DE LOS FITOPLASMAS

Tamaño y composición

El contenido porcentual de G + C en el ADN cromosómico de los fitoplasmas se encuentra estimado entre el 23 y el 29%. Este porcentaje es una característica de afiliación filogenética de los fitoplasmas con respecto a los miembros de la clase Mollicutes, ya que al igual que estos, los fitoplasmas contienen una molécula de ADN cromosómica circular de doble cadena y un conjunto limitado de enzimas metabólicas (Neimark y Kirkpatrick, 1993; Tran-Nguyen et al., 2008). Contienen alrededor de 300 y 900 genes en su genoma y a diferencia de los micoplasmas, los fitoplasmas utilizan diferentes mecanismos de recombinación para adaptarse a los entornos de plantas e insectos, volviéndose dependientes de la asimilación de nutrientes por parte del hospedero (Bai et al., 2006).

Las características genómicas de los fitoplasmas se han determinado mediante purificaciones o soluciones enriquecidas a partir de plantas infectadas o vectores, mediante irradiación gama y electroforesis en gel por campo pulsado (Lee et al., 2000).

Recientemente, con la adopción de las plataformas NGS y de tecnologías que facilitan el análisis bioinformático de la información generada, se han publicado los genomas completos de algunos fitoplasmas y se tiene un mayor conocimiento de su tamaño y composición, así como del contenido de proteínas, ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosomales (ARNr), número de genes presentes y las vías metabólicas con las que cuentan (Cuadro 1) (Saccardo et al., 2012).

CUADRO 1
 Características generales de los genomas de fitoplasmas publicados en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) a partir del año 2003 al 2017. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), México, 2017.

Año	Grupo	Nombre de Candidatus Phytoplasma	Referencia de la Secuencia (NCBI)	NCBI Genome ID	Tamaño (Mbp)	GC (%)	Proteínas	ARNr	ARNt	Genes (N°)	Pseudogen	Referencia
2003	16SrI	Onion yellows phytoplasma	NC_005303.2	1125	0,85	27,8	743	6	32	908	124	Oshima et al., 2002
2006	16SrI	Aster yellows witches'-broom phytoplasma	NC_007716.1	1270	0,71	26,9	534	6	32	652	80	Bai et al., 2006
2008	16SrX	Phytoplasma mali	NC_011047.1	1695	0,60	21,4	493	6	32	541	9	Kube et al., 2008
2012	16SrIII	Vaccinium witches'-broom phytoplasma	NZ_AKIN000000000.1	30546	0,65	27,4	507	-	27	688	150	Saccardo et al., 2012
2012	16SrIII	Italian clover phyllody phytoplasma	NZ_AKIM000000000.1	30545	0,60	27,1	498	3	29	655	125	Saccardo et al., 2012
2012	16SrIII	Milkweed yellows phytoplasma	NZ_AKIL000000000.1	30544	0,58	27,4	455	3	29	554	67	Saccardo et al., 2012
2012	16SrIII	Poinsettia branch-inducing phytoplasma	NZ_AKIK000000000.1	30543	0,63	27,3	527	2	28	663	104	Saccardo et al., 2012
2013	16SrII	Peanut witches'-broom phytoplasma	NZ_AMWZ01000014.1	13172	0,56	24,4	441	6	27	501	26	Chung et al., 2013
2013	16SrXII	Phytoplasma australiense	NC_010544.1	1752	0,88	27,4	699	6	34	819	80	Andersen et al., 2013
2014	16SrXII	Phytoplasma solani	-	22995	0,57	28,7	520	-	27	520	-	Mitrović et al., 2014
2014	16SrI	'C. coronarium' phytoplasma	NZ_BBIY000000000.1	33157	0,74	27,6	651	-	28	899	217	Kakizawa et al., 2014
2014	16SrI	Wheat blue dwarf phytoplasma	NZ_AVAO000000000.1	15538	0,61	27,2	471	6	32	588	76	Chen et al., 2014
2015	16SrII	'E. purpurea' witches'-broom phytoplasma	NZ_LKAC000000000.1	40404	0,55	23,9	423	6	26	493	37	Chang et al., 2015
2015	16SrIII	Phytoplasma pruni	NZ_LHCF000000000.1	40049	0,60	27,1	430	-	29	588	124	Lee et al., 2015
2015	16SrIX	Phytoplasma phoenicium	NZ_JPSQ000000000.1	39170	0,35	25,1	286	-	3	345	55	Quaglino et al., 2015
2015	16SrI	Chrysanthemum yellows phytoplasma	NZ_JSWH000000000.1	35475	0,66	28,3	546	-	28	735	154	Pacifico et al., 2015
2016	16SrIII	Phytoplasma (plant yellows agents)	-	16324	0,72	27,9	-	-	-	-	-	Zamorano y Fiore, 2016
2016	16SrXI	Phytoplasma oryzae	NZ_LTBM000000000.1	43745	0,53	19,3	429	-	10	459	19	Fischer et al., 2016
2016	16SrI	Maize bushy stunt phytoplasma	NZ_CP015149.1	11081	0,58	28,5	498	6	32	573	34	Orlovskis et al., 2016
2016	16SSrI	Rice orange leaf phytoplasma	NZ_MIEP000000000.1	49765	0,60	28,2	536	4	31	600	29	Zhu et al., 2016
2017	16SrII	Candidatus Phytoplasma aurantifolia	NZ_MWKN000000000.1	MWKN000000000.1	0,47	23,8	370	-	19	449	59	Foissac y Carle, 2017

Table 1. General characteristics of phytoplasmas genomes published in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) from 2003 to 2017. National Center of Phytosanitary Reference (CNRF), Mexico, 2017.

Oshima et al. (2002), Bai et al. (2006), Kube et al. (2008), Saccardo et al. (2012), Chung et al. (2013), Andersen et al. (2013), Mitrović et al. (2014), Kakizawa et al. (2014), Chen et al. (2014), Chang et al. (2015), Lee et al. (2015), Quaglino et al. (2015), Pacifico et al. (2015), Zamorano y Fiore (2016), Fischer et al. (2016), Orlovskis et al. (2016), Zhu et al. (2016), Foissac y Carle (2017)

Se estima que el tamaño genómico de los fitoplasmas se encuentra en un rango de 0,35 a 0,88 Mbp. En los Mollicutes cultivables, dicho rango varía entre <0,60 a 2,20 Mbp, en los *Mycoplasma* spp., los tamaños de genoma oscilan entre 0,58 hasta 1,38 Mbp. Los *Spiroplasma* spp. poseen un intervalo aún mayor de 2,20 a 7,80 Mbp. En el género *Acholeplasma*, el rango de tamaño en el genoma es más estrecho, variando entre 1,50 y 1,65 Mbp (Razin et al., 1998; Marcone et al., 1999; Gasparich, 2010).

El análisis comparativo de la información genómica de los fitoplasmas, evidenció que su ADN se organiza en grandes grupos de Unidades Móviles Potenciales (PMUs, por sus siglas en inglés), los cuales contienen Secuencias de Inserción (IS, por las siglas en inglés de Insertion Sequences) de distintos genes conservados, incluyendo los genes de recombinación (*tra5*, *ssb*, *himA*) y replicación (*dnaG*, *dnaB*), lo que sugiere que las PMU son transposones compuestos replicativos (Bai et al., 2006).

El genoma de los fitoplasmas codifica un menor número de proteínas con funciones metabólicas en comparación con los genomas de algunos micoplasmas, como la ausencia del ciclo de las pentosas fosfato y la inexistencia de las subunidades de la ATPsintasa, que se creían esenciales para la vida (Oshima et al., 2004). Esto puede ser resultado de una evolución reductiva, como consecuencia de una vida como parásitos intracelulares en un ambiente rico en nutrientes. Además, poseen proteínas de membrana que, hasta el momento, se cree que son exclusivas de los fitoplasmas (Hongenhout y Music, 2010).

Genomas publicados

Entre las secuencias de genomas publicadas se encuentran “*Ca. Phytoplasma onion yellows* OY-M” [16SrI] (Oshima et al., 2002) con un tamaño de 0,85 Mbp, “*Aster yellows witches’-broom phytoplasma*” (AY-WB) [16SrI] con 0,71 Mbp (Bai et al., 2006) y “*Ca. Phytoplasma asteris*” [16SrI] con 0,6 Mbp (Zhu et al., 2017). Aunque estos fitoplasmas se encuentran clasificados dentro del grupo 16SrI por los perfiles enzimáticos que presentan, poseen diferencias genómicas, ya que AY-WB es 0,14 Mbp más pequeño que el genoma de OY-M como resultado de un menor número de secuencias múltiples dentro de su genoma, incluyendo PMUs.

El genoma de “*Ca. Phytoplasma australiense*” (subgrupo *tuf*-Australia I; *rp*-A) [16SrXII-B], fue descrito por Tran-Nguyen et al. (2008), quienes además realizaron un análisis comparativo entre este y OY-M y AY-WB. Los resultados mostraron que “*Ca. Phytoplasma australiense*” posee un cromosoma más grande (18,693 pb más que OY-M), así como un mayor número de genes con función asignada y la presencia de un mayor número de proteínas reportadas con función desconocida con respecto a los dos genomas anteriormente obtenidos, por lo que, ahora se conoce que los fitoplasmas se someten a una evolución rápida en su genoma como consecuencia de su ciclo de vida (Tran-Nguyen et al., 2008).

Se ha reportado un tamaño de 0,6 Mbp en el genoma de “*Ca. Phytoplasma mali*” [16SrX], con un contenido de G + C de 21,4%, así como limitadas capacidades metabólicas que reflejan características hasta el momento únicas de este fitoplasma (Kube et al., 2008) (Cuadro 1). En comparación con los genomas que incluye el grupo 16SrI (AY-WB y OY-M) y “*Ca. P. australiense*”, “*Ca. P. mali*” tiene un menor número de genes parálogos que permiten acumular mutaciones sin que el individuo pierda las funciones de dicho gen, generando nuevas proteínas con función similar y un menor número de inserciones de posibles elementos móviles de ADN, además de poseer un conjunto de genes de recombinación homóloga (Kube et al., 2008).

Otros genomas de fitoplasmas han sido secuenciados y publicados, entre los que se encuentran, el genoma de “*Ca. Phytoplasma pruni*” [16SrIII] (Saccardo et al., 2012), el de “*Ca. Phytoplasma phoenicium*” [16SrIX] que, hasta el momento, es el genoma reportado más pequeño con 0,35 Mbp (Quaglino et al., 2015), y recientemente el genoma de “*Ca. Phytoplasma aurantifolia*” [16SrII] con 0,47 Mbp (Foissac y Carle, 2017) (Cuadro 1).

Marcadores genéticos

Distintas regiones, genes y proteínas, se han empleado como marcadores en la identificación de los fitoplasmas, incluyendo el gen 16SrRNA, el factor de elongación de la traducción (*tuf*), la proteína de la subunidad translocasa Y (*secY*) (Foissac et al., 2013), proteínas en el operon ribosomal (*rp*) (Martini et al., 2007), el espacio intergénico (IGS) entre 16S–23S (Smart et al., 1996), la proteína de la subunidad translocasa A (*secA*), genes no ribosomales como *map* y *pnp*, así como los genes que codifican las proteínas de superficie variables: *vmp1* (Cimerman et al., 2009), *imp* (Kakizawa et al., 2006b), *amp* (Kakizawa et al., 2006a), *stamp* (Fabre et al., 2011), *groEL* (Mitrović et al., 2011) y *hflB* (Seemüller y Schneider, 2007).

Los genes *nusA*, *PNPase*, *Ata*, el factor vinculante de *cmp* (CBF) y otros genes han sido identificados por medio de la secuenciación del genoma de Aster yellows witches'-broom phytoplasma (AY-WB) [16SrI] (Bai et al., 2004).

CLASIFICACIÓN DE LOS FITOPLASMAS

Uno de los métodos más comunes para la identificación de los fitoplasmas es el propuesto por Lee et al. (1998b), el cual consiste en una PCR anidada con el empleo de dos pares de oligonucleótidos basados en la región 16SrRNA. El producto final es digerido con enzimas de restricción mediante la técnica de RFLP, y los patrones resultantes de la digestión enzimática son comparados con lo reportado por el mismo autor. Sin embargo, algunos grupos de fitoplasmas comparten un mismo patrón de bandeo durante el análisis enzimático por RFLP, por lo que, esta técnica resulta inapropiada para una diferenciación más fina de fitoplasmas (Marcone et al., 2000; Foissac et al., 2013).

Si bien la clasificación enzimática realizada por Lee et al. (1998b) fue el antecedente para la clasificación de los fitoplasmas, el uso de otros genes y regiones independientes al 16Sr han permitido establecer relaciones evolutivas y proponer nuevas clasificaciones, incluso de grupos específicos. Tal es el caso del gen *secY* que ha proporcionado una subdivisión más detallada del grupo 16SrI "*Aster yellows*", al encontrar diferencias entre muestras del mismo grupo, dando lugar a diez linajes genéticamente distintos con respecto a 16Sr (Lee et al., 2006). Por su parte, Marcone et al., (2000) clasificaron al mismo grupo con el análisis filogenético de secuencias basadas en el gen *tuf*.

Un análisis filogenético, con secuencias del gen 23S y *secA*, fue presentado por Hodgetts et al. (2008) como una alternativa molecular para diferenciar distintos grupos y subgrupos de fitoplasmas, esto a pesar de que *secA* se encuentra disponible en una sola copia en el genoma de fitoplasmas. Además, examinaron las relaciones evolutivas entre grupos específicos previamente clasificados mediante 16SrRNA. Por su parte, Martini et al. (2007) también clasificaron filogenéticamente distintos grupos de fitoplasmas, basándose en dos genes de la proteína ribosomal (*rp*), *rplV* (*rpl22*) y *rpsC* (*rps3*). Además, añadieron al análisis filogenético la comparación con otros Mollicutes y bacterias Gram positivas con el fin de evaluar la eficacia de los genes empleados, teniendo buenos resultados y una diferenciación más detallada con respecto al 16Sr.

Actualmente, existen herramientas virtuales que permiten generar simulaciones de experimentos basados en biología molecular de manera In silico. Tal es el caso de la plataforma *iPhyClassifier*, que permite clasificar a los fitoplasmas teniendo como base una secuencia de interés, con la cual se genera un gel virtual donde son observados los patrones enzimáticos dependiendo de la enzima seleccionada (Zhao et al., 2009).

Otra forma de identificar y clasificar a los fitoplasmas es mediante un análisis bioinformático, realizando agrupaciones filogenéticas de secuencias (Wei et al., 2007) o por comparación con respecto a las secuencias depositadas en el NCBI (Benson et al., 2013).

TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN

Inicialmente la identificación de fitoplasmas se realizó mediante técnicas como Western Blot, hidrólisis de ADN, separación mediante centrifugación, Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por las siglas en inglés de *High Performance Liquid Chromatography*), hibridación, entre otras (Kollar y Seemüller, 1989). Sin embargo, la inclusión de la técnica de PCR y de sus variantes han permitido complementar su diagnóstico, además de corroborar, cuantificar e incluso identificar nuevos fitoplasmas (Torres et al., 2005; Obura et al., 2011; Pérez-López et al., 2017).

PCR convencional

La especificidad de la PCR deriva del diseño de los oligonucleótidos, los cuales reconocen una secuencia específica que será amplificada por la enzima Taq polimerasa. Para tal motivo, se han diseñado oligonucleótidos a partir de distintas regiones, genes y proteínas, algunos diseñados para identificar la presencia o ausencia de los fitoplasmas denominados “oligonucleótidos generales”, y otros con secuencias específicas para determinados grupos y subgrupos denominados “oligonucleótidos específicos”. En el Cuadro 2 se presentan distintas secuencias de oligonucleótidos diseñados para PCR convencional que amplifican la región 16SrRNA. Posteriormente, se presentan los oligonucleótidos diseñados a partir de la región espaciadora (SR) entre 16S-23SrRNA (Cuadro 3), el factor de elongación de la traducción (*tuf*), genes de proteínas ribosómicas (rp) (Cuadro 4); finalmente, en el Cuadro 5 se presentan las secuencias de oligonucleótidos para los genes *secY*, *secA*, *spc* y *uvrB*.

CUADRO 2
Secuencias y características de oligonucleótidos para PCR convencional que amplifican la región 16S rRNA. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), México, 2017.

Tipo	Nombre	(Secuencia 5´-3´)	Tamaño del amplicón (pb)	Región o gen	Especificidad	Referencia
Forward	fU5	CGGCAATGGAGGAACT				Lorenz et al., 1995
Reverse	rU3	TTCAGCTACTCTTTGTAACA	882	16SrRNA	Generales	
Forward	f01	CGGAACTTTTAGTTTCAGT				Lorenz et al., 1995
Reverse	r01	AAGTGCCCAACTAAATGAT	1050	16SrRNA	16SrX	
Forward	Fu2W	ATAATGGAGGTCATCAG				Ahrens et al., 1994
Reverse	rWX	CGAAGTTAGGTGACCGCTTTG	430	16SrRNA	16SrX	
Forward	R16F1	AAGACGAGGATAACAGTTGG				Lee et al., 1995
Reverse	R16R0	GGATACCTTGTACGACTTAACCCC	1800	16SrRNA	Generales	
Forward	R16F2	ACGACTGCTGCTAAGACTGG				Lee et al., 1993
Reverse	R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	1248	16SrRNA	Generales	
Forward	P1-ATT	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGG				Makarova et al., 2013
Reverse	P62Sr	ACTTAYTAAACCGCTACRCACC	600	16SrRNA	Generales	
Forward	P1-ATT	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGG				Makarova et al., 2013
Reverse	P7	CGTCCTTCATCGGCTCTT	1600	16SrRNA	Generales	
Forward	R16mF2	CATGCAAGTCGAACGGA				Gundersen y Lee, 1996
Reverse	R16mR1	CTTAACCCCAATCATCGAC	1435	16SrRNA	Generales	
Forward	R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG				Gundersen y Lee, 1996
Reverse	R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	1248	16SrRNA	Generales	
Forward	SN910601	GTTTGATCCTGGCTCAGGATT				Namba et al., 1993
Reverse	SN920204	CCTCAGCGTCAGTAA	750	16SrRNA	Generales	
Forward	SN920203	TTTAAGCAATTAACTTTA				Namba et al., 1993
Reverse	SN920202	ATGCACCACCTGTATCC	1030	16SrRNA	16SrI y III	
Forward	SN920203	TTTAAGCAATTAACTTTA				Namba et al., 1993
Reverse	SN910502	AACCCCGAGAACGTATTACC	1306	16SrRNA	16SrI	
Forward	16R758F	GTCTTTACTGACGCTGAGGC				Gibb et al., 1995
Reverse	16R1232R	CTTCAGCTACCCCTTTGTAAC	513	16SrRNA	Generales	
Forward	R16(X)F1	GACCCGCAAGTATGCTGAGAGATG				Lee et al., 1995
Reverse	R16(X)R1	CAATCCGAAGTGAAGTGT	1149	16SrRNA	16SrX	
Forward	R16(V)F1	TTAAAAGACCTTCTTCGG				Lee et al., 1994
Reverse	R16(V)R1	TTCAATCCGTAAGTGAAGTACC	1156	16SrRNA	16SrV	
Forward	R16(I) F1	TAAAAGACCTAGCAATAGG				Lee et al., 1994
Reverse	R16(I)R1	CAATCCGAAGTGAAGTGT	1020	16SrRNA	16SrI	
Forward	SN910601	GTTTGATCCTGGCTCAGGATT				Namba et al., 1993
Reverse	SN920202	ATGCACCACCTGTATCC	1031	16SrRNA	16SrXI	
Forward	LY16Sf	CATGCAAGTCGAACGGAATC				Harrison et al., 2002
Reverse	LY16Sr	GCTTACGCAGTTAGGCTGTC	1400	16SrRNA	16SrIV	
Forward	ALW-F2	AGAGTAGCTACAACGTGAGTT				Abou-Jawdah et al., 2003
Reverse	ALW-R2	GAGCTATAGGCCAGGAT	390	16SrRNA	16SrIX	

Table 2. Sequences and characteristics of oligonucleotides for conventional PCR primers for the 16S rRNA region. Nacional Center of Phytosanitary Reference (CNRF), Mexico, 2017. Abou-Jawdah et al. (2003), Ahrens et al. (1994), Gibb et al. (1995), Gundersen y Lee (1996), Harrison et al. (2002), Lee et al. (1993, 1994, 1995), Lorenz et al. (1995), Makarova et al. (1993), Namba et al. (1993)

CUADRO 3

Secuencias y características de oligonucleótidos para PCR convencional que amplifican entre la región 16S rRNA y la región espaciadora (SR) 16S-23SrRNA. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), México 2017.

Tipo	Nombre	(Secuencia 5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Región o Gen	Especificidad	Referencia
Forward Reverse	P1 BLTVaint	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT GATGATTTAGTATATATAGTCC	1450	16SrRNA y SR	16SrVI	Deng y Hiruki, 1991; Smart et al., 1996
Forward Reverse	P1 Wxint	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT GACAGTGCTTATAACTTTTA	1600	16SrRNA y SR	16SrIII	Deng y Hiruki, 1991; Smart et al., 1996
Forward Reverse	P1 AYint	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT TACAATTGCAAGCAAGTTAC	1500	16SrRNA y SR	16SrI	Deng y Hiruki, 1991; Smart et al., 1996
Forward Reverse	P1 Tint	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT TCAGGCGTGTGCTCTAACCAGC	1600	16SrRNA y SR	Generales	Deng y Hiruki, 1991; Smart et al., 1996
Forward Reverse	P1 PYLRint	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CCCGGCCATTATTAATTTTATC	1550	16SrRNA y SR	16SrX-A, B	Deng y Hiruki, 1991; Smart et al., 1996
Forward Reverse	fB1 rULWS1	GACCCCTTCAAAGGTCTTAG CGTCTTTTATATAAGAGAAACA	1500	16SrRNA y SR	16SrV	Smart et al., 1996
Forward Reverse	fB1 rASHYS	GACCCCTTCAAAGGTCTTAG GCAGGACCGTTTATATTAATC	1500	16SrRNA y SR	16SrVII	Smart et al., 1996
Forward Reverse	fPD rPDS	GACCCGTAAGGTATGCTGA CCCGGCCATTATTAATTTTA	1400	16SrRNA y SR	16SrX-C	Lorenz et al., 1995
Forward Reverse	fAT rAS	CATCATTTAGTTGGGCACTT GGCCCCGGACCATTATTTATT	500	16SrRNA y SR	16SrX	Smart et al., 1996
Forward Reverse	fAT rPRUS	CATCATTTAGTTGGGCACTT GGCCAAGCCATTATTGATT	500	16SrRNA y SR	16SrX	Smart et al., 1996
Forward Reverse	16R723f m23SR	GAAGGCGGCTTGCTGGGTCT TAGTGCCAAGGCATCCACTGTG	1076	16SrRNA y SR	16SrXI-B	Padovan et al. 1995
Forward Reverse	P1 P7	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	1800	16SrRNA y 23SrRNA	Generales	Deng y Hiruki, 1991; Schneider et al., 1995
Forward Reverse	P23S5F3 A23S3R3	GTGGATGCCTTGCACTAAGAGCC ACTTACACACCTGGCCTATCAACC	2700	23SrRNA	16SrIX	Azadvar y Baranwal, 2010

Table 3. Sequences and characteristics of oligonucleotides for conventional PCR primers for the region between 16S rRNA and the 16S-23S rRNA Spacer Region (SR). Nacional Center of Phytosanitary Reference (CNRF), Mexico 2017. Azadvar y Baranwal (2010), Deng y Hiruki (1991), Lorenz et al. (1995), Padovan et al. (1995), Schneider et al. (1995), Smart et al. (1996)

CUADRO 4

Secuencias y características de oligonucleótidos para PCR convencional que amplifican el factor de elongación de la traducción (*tuf*) y genes de proteínas ribosómicas (*rp*). Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), México 2017.

Tipo	Nombre	(Secuencia 5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Región o gen	Especificidad	Referencia
Forward	rp(IX)F2	GCACAAGCTATTTTAATGTTTACACCC	800	<i>rp</i>	16SrIX	Martini et al., 2007
Reverse	rp(IX)R2	CAAAGGGACTAAACCTAAAG				
Forward	rpL2F3	WCCTTGGGGYAAAAAGCTC	1600	<i>rp</i>	16SrI, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XII, XIII, XVIII	Martini et al., 2007
Reverse	rp(I)R1A	GTTCTTTTGGCATTAAACAT				
Forward	rpStoIF	CGTACAAAATAATCGGGAGA	1372	<i>rp</i>	16SrXII-A	Martini et al., 2007
Reverse	rpStoIR	CGAAACAAAAGGTTTACGAG				
Forward	rpStoIF2	AAACTTGGTCACGTAGTTCC	1253	<i>rp</i>	16SrXII-A	Martini et al., 2007
Reverse	rpStoIR	CGAAACAAAAGGTTTACGAG				
Forward	rpFIC	ATGGTDGGDCAYAAATTAGG	1212-1386*	<i>rp</i>	16SrI, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XII, XIII, XVIII	Martini et al., 2007
Reverse	rp(I)R1A	GTTCTTTTGGCATTAAACAT				
Forward	rp(II)F1	GCTCTTACTCGTAAAYATGTAGT	1200	<i>rp</i>	16SrII	Martini et al., 2007
Reverse	rp(II)R1	TFACTTGATTTTCTGGTTTTGA				
Forward	rp(III)F1	TTAGAGAAGGCATTAAAC	1200	<i>rp</i>	16SrIII	Martini et al., 2007
Reverse	rp(III)R1	CTCTTTCCCCCTCTAGGACG				
Forward	rpF1	GGACATAAGTTAGGTGAATTT	1245-1389*	<i>rp</i>	16SrI, III, IV, V, VII, VIII, IX, XIII	Lim y Sears, 1992
Reverse	rpR1	ACGATATTTAGTCTTTTTTGG				
Forward	rp(I)FIA	TTTTCCCTACACGTACTTA	1200	<i>rp</i>	16SrI	Lee et al., 2004a
Reverse	rp(I)R1A	GTTCTTTTGGCATTAAACAT				
Forward	rp(V)F1A	AGGCGATAAAAAAGTTTCAAAA	1200	<i>rp</i>	16SrV	Lee et al., 2004b
Reverse	rp(V)R1A	GGCATTAAACATAATATATTATG				
Forward	rpF2	TCTCGTACTTTTCGTGG	1200	<i>rp</i>	16SrVI, X	Gundersen et al., 1994
Reverse	rpR2	ACCTTTAGTCTTTGGAA				
Forward	rp(V)F1	TCGCGGTCATGCAAAAGGCG	1200	<i>rp</i>	16SrV	Lee et al., 1998b
Reverse	rpR1	ACGATATTTAGTCTTTTTTGG				
Forward	rp(VI)F2	GGTTGTTGATTTAATTCGTGGTC	1000	<i>rp</i>	16SrVI	Martini et al., 2007
Reverse	rp(VI)R2	CCAGATATTCGTCTAGTATCAGAA				
Forward	rp(VIII)F2	AGTTGTCGATTTAATTCGTGGCA	1000	<i>rp</i>	16SrVII, VIII	Martini et al., 2007
Reverse	rp(VIII)R2	CAGCAGATATTTGTCTAGTATCTGCG				
Forward	Tuf340a	GCTCCTGAAGAAARAGAACGTGG	550	<i>tuf</i>	16SrI, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI, XII, XV, XX, XXI	Makarova et al., 2013
Reverse	Tuf890a	ACTTGDCCTCTTTCKACTCTACCAGT				
Forward	Tuf340b	ACTAAAGAAGAAAAAGAACGTGG	550	<i>tuf</i>	16SrI, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI, XII, XV, XX, XXI	Makarova et al., 2013
Reverse	Tuf890rb	ATTTGTCCTCTTTWCACAGTCCTGT				
Forward	Tuf400a	GTAACGACGCGCCAGTGAAACAGA AAAAACGTCAYTATGCTCA	400	<i>tuf</i>	Generales	Makarova et al., 2013
Reverse	Tuf835a	TAATACGACTCACTATAGGGAACATCT TCWACHGGCATTAAAGAAAGG				
Forward	Tuf400b	GTAACGACGCGCCAGTGAAACTTCT AAAAGACATTACGCTCA	400	<i>tuf</i>	Generales	Makarova et al., 2013
Reverse	Tuf835b					
Forward	Tuf400c		400	<i>tuf</i>	Generales	Makarova et al., 2013
Reverse	Tuf835c	TAATACGACTCACTATAGGGAACATCT TCTATAGGTAATAAAAAAGG				
Forward	FDTUF-F2	TTGTCAGAACAGGATTAGC	1164	<i>tuf</i>	16SrV	Malembic-Maher et al., 2008
Reverse	FDTUF-R2	CTTGTTCCCTCTTCGATCGC				
Forward	FDTUF-F1	ATTGGTCATGTAGACCATGG	1164	<i>tuf</i>	16SrV	Malembic-Maher et al., 2008
Reverse	FDTUF-R1	GTTCTCCGCCTTCACGTAC				
Forward	fTuf1	CACATTGACACGGTAAAC	949-1007*	<i>tuf</i>	16SrI y XII-A	Schneider et al., 1997
Reverse	rTuf1	CCACCTTCACGAATAGAGAAC				
Forward	fTufAy	GCTAAAAGTAGAGCTTATGA	940	<i>tuf</i>	16SrI y XII-A	Schneider et al., 1997
Reverse	rTufAy	CGTTGTCACCTGGCATTACC				
Forward	PaTC1F	CATTCTAGTTGTTTCTGGT	815	<i>tuf</i>	16SrI y XII-A	Andersen et al., 2006
Reverse	PaTC1R	GTCTTCTCGGTTAATC				
Forward	PaTC2F	TATTTTGTGTTTCTGGA	949	<i>tuf</i>	16SrI y XII-A	Andersen et al., 2006
Reverse	PaTC2R	GTCTTCGCGGTTAATA				

*El tamaño del amplicon puede variar dependiendo del grupo / Amplicon size can vary depending on the group.

Table 4. Sequences and characteristics of oligonucleotides for conventional PCR primers for the translation elongation factor (*tuf*) and ribosomal protein (*rp*) genes. Nacional Center of Phytosanitary Reference (CNRF), Mexico 2017. Andersen et al. (2006), Gundersen et al. (1994), Lee et al. (1998b, 2004a, 2004b), Lim y Sears (1992), Malembic-Maher et al. (2008), Makarova et al. (2013), Martini et al. (2007), Schneider et al. (1997)

CUADRO 5
Secuencias y características de oligonucleótidos para PCR convencional que amplifican secuencias del gen *secY*, *secA*, *spc* y *uvrB*. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), México, 2017.

Tipo	Nombre	(Secuencia 5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Región o gen	Especificidad	Referencia
Forward	AYsecYF1	CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGG	1400	SecY	16SrI	Lee et al., 2006
Reverse	AYsecYR1	CAGAAGCTTGAGTGCCTTACCG				
Forward	FD9f	GAATTAGAAGCTGTTTGAAGAC	1300	SecY	16SrV	Daire et al., 1997
Reverse	FD9r	TTTGCTTTCATATCTTGATCG				
Forward	STOL11f2	TATTTTCCTAAAATTGATTGGC	990	SecY	16SrXII	Daire et al., 1997
Reverse	STOL11r1	TGTTTTTGCACCGTTAAAGC				
Forward	SecYF1(II)	CGCGTATAGGTTTTGAAGGTG	2200	SecY	16SrII	Lee et al., 2010
Reverse	SecYR1(II)	CCTGCCATTTTCATTATAGCG				
Forward	SecYF1(III)	CTAGACCAGGTTTTGAAGG	2200	SecY	16SrIII	Lee et al., 2010
Reverse	SecYR1(III)	GACCTGCTTTTCTCATTATAGC				
Forward	SecYF1(VI)	CTAGATTAGGATTYGAGGG	2200	SecY	16SrVI	Lee et al., 2010
Reverse	SecYR1(VI)	GACCRCCAAAACCTTGATAATC				
Forward	SecYF1(X)	GGTGGTGTAGACCAGGTTT	2200	SecY	16SrX	Lee et al., 2010
Reverse	SecYR1(X)	GGAATACCTGAACAACCTAC				
Forward	SecYF2a	CTCTTCGMCCYGGTTTTGAAGG	2800	SecY	16SrXII	Lee et al., 2010
Reverse	SecYR1(XII)	CAGGAACCTAATCTCCCTTGAG				
Forward	FD9r2L	TAAAAGACTAGTCCCRCCAAAAG	1007-1031*	SecY	16SrV	Arnaud et al., 2007
Reverse	FD9f3L	AATAAGGTAGTTTATATGACAAG				
Forward	SecYMalF1	TTAGGACGTAGTATACAAATCCNTT	664	SecY	16SrX	Danet et al., 2011
Reverse	SecYMalR1	ACAATAATTAATAATCCTGTNCC				
Forward	SecAfor1	GARATGAAAACCTGGRGAAGG	840	SecA	Generales	Hodgetts et al., 2008
Reverse	SecArev3	GTTTTRGAGTTCCTGTCTATNCC				
Forward	SecAfor2	GAYGARGSWAGAACKCCT	480	SecA	Generales	Hodgetts et al., 2008
Reverse	SecArev3	GTTTTRGAGTTCCTGTCTATNCC				
Forward	L15F1	CCTGGTAGTGGYAMTGGWAAAAC	1700	spc operon	16SrI-VIII, X, XII, XIII, XVIII	Lee et al., 2010
Reverse	MapR1	ATTARRAATATARGGYTCTTCRTG				
Forward	L15F1a-a	TGGWAAAACCTKCBGGWAARGG	2800	spc operon	16SrI, XII, XIII	Lee et al., 2010
Reverse	MapR1a-a	AAGMTKYACCRATDCCATG				
Forward	L15F1a-b	GGWAAAACYTSHGGYMRVGGHCATAAAGG	2200	spc operon	16SrII, III, V, VI	Lee et al., 2010
Reverse	MapR1a-b	CCWATMCCRTGWCCDGWAAAA				
Forward	L15F1a(III)	CTTCTGGTAAAGGACATAAAGG	2200	spc operon	16SrIII	Lee et al., 2010
Reverse	MapR1a(III)	GGTTCTTCGTGCAATTGCAAAACC				
Forward	MFD32g1	TAGGAATTAAAGTAGCTTATCTTCATAGTG	1126	uvrB	16SrV	Arnaud et al., 2007
Reverse	MFD32gN1	CTGGTGTTTATGATTGTTTAGTTGGA				

Table 5. Sequences and characteristics of oligonucleotides for conventional PCR primers for the *secY*, *secA*, *spc* and *uvrB* gene. Nacional Center of Phytosanitary Reference (CNRF), Mexico, 2017. Arnaud et al. (2007), Danet et al. (2011), Daire et al. (1997), Hodgett et al. (2008), Lee et al. (2006, 2010)

PCR cuantitativa (qPCR)

La implementación de la qPCR ha permitido la eliminación del procesamiento post-PCR, debido a la utilización de sondas u oligonucleótidos fluorogénicos que permiten la detección cuantitativa de pequeñas cantidades de ADN en lapsos relativamente cortos, así como la visualización y el monitoreo de los productos de PCR a medida que se acumulan, es decir, en tiempo real. Para ello, se pueden utilizar diversos tipos de químicas de detección para monitorear los productos como las sondas de hidrólisis TaqMan® o el compuesto SYBR® Green, entre otros (Arya et al., 2005).

El uso de la qPCR para la detección de fitoplasmas se ha empleado en trabajos como los de Christensen et al. (2004), mostrando la detección y cuantificación de distintos grupos de fitoplasmas. El colorante fluorescente SYBR® Green I se ha empleado para la detección y cuantificación de “*Ca. Phytoplasma pyri*”, “*Ca. Phytoplasma prunorum*” y “*Ca. Phytoplasma mali*”, todos miembros del grupo 16SrX, diferenciándolos

mediante curvas de cuantificación (Torres et al., 2005). Adicionalmente, otros grupos de fitoplasmas como 16SrI, 16SrV, 16SrX, 16SrXII y 16SrXII-A, entre otros, han sido detectados con esta técnica (Angelini et al., 2007; Bisognin et al., 2008; Galetto et al., 2005).

En el Cuadro 6 se presenta una lista de oligonucleótidos publicados para la técnica de qPCR.

CUADRO 6
Secuencias y características de oligonucleótidos y sondas para PCR cuantitativa (qPCR). Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), México, 2017.

Tipo	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Tamaño del amplicón (pb)	Región o gen	Especificidad	Referencia
Forward primer	Forward primer	CGTACGCAAGTATGAACTTAAAGGA	75	16SrRNA	Generales	Christensen et al., 2004
Reverse primer	Reverse primer	TCTTCGAATTAAACAACATGATCCA				
Sonda	Probe	TGACGGGACTCCGCACAAGCG				
Forward	qAP-16S-F	CGAACGGGTGAGTAACACGTAA	74	16SrRNA	16SrX	Baric y Dalla-Via, 2004
Reverse	qAP-16S-R	CCAGTCTTAGCAGTCGTTTCCA				
Sonda	qAP-16S	TAACCTGCCTCTTAGACG				
Forward	UniRNA-F	AAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAG	73	16SrRNA	Generales	Hren et al., 2007
Reverse	UniRNA-R	AACCTAACATCTCACGACACGAACT				
Sonda	UniRNA-P	ACGACAACCATGCACCA				
Forward	FDgen-F	TTATGCCTTATGTTACTGCTTCTATTGTTA	85	<i>secY</i>	16SrV	Hren et al., 2007
Reverse	FDgen-R	TCTCCTTGTTCTTGCCATTCTTT				
Sonda	FDgen-P	ACCTTTTGACTCAATTGA				
Forward	Bngen-F	AAGCAGGTTTAGCGATGGTTGT	71	<i>Stol11</i>	16SrV	Hren et al., 2007
Reverse	Bngen-R	TGGTACCGTTGCTTCATCATTT				
Sonda	Bngen-P	TTAATACCACCTTCAGGAAA				
Forward	fAT	CATCATTTAGTTGGGCACTT	137	16srRNA	16SrX	Bisognin et al., 2008
Reverse	rATRT	CGCTTCAGTACTCTTTGTG				
Sonda	pAT	CCCTTATGACCTGGGCTACA				
Forward	qAP-16S-F	CGAACGGGTGAGTAACACGTAA	74	16SrRNA	16SrX	Baric y Dalla-Via, 2004; Aldagui et al., 2007
Reverse	qAP-16S-R	CCAGTCTTAGCAGTCGTTTCCA				
Sonda	AP-MGB	CTGCCTCTTAGACGAGG				
Forward	AsY-F	TTGGGTTAAGTCCCAGAAC	102	16SrRNA	16SrI	Angelini et al., 2007
Reverse	AsY-R	CCCACCTTCCTCCAATTTATCA				
Sonda	AsY-P	CCAGCACGTAATGGTGGGGACTT				
Forward	Flaves-F	AAGTCGAACGGAGACCCCTTC	103	16SrRNA	16SrV	Angelini et al., 2007
Reverse	Flaves-R	TAGCAACCGTTTCCGATTGT				
Sonda	Flaves-P	AAAAGGTCTTAGTGCGAACGGGT				
Forward	BN-F	GGTTAAGTCCCAGCAACGAG	98	16SrRNA	16SrXII	Angelini et al., 2007
Reverse	BN-R	CCCACCTTCCTCCAATTTATCA				
Sonda	BN-P	AACCCTTGTTGTTAATGCCATCATTAAAG				
Forward	Bngen-F	AAGCAGGTTTAGCGATGGTTGT	71	<i>Genomic fragment</i>	16SrXII	Hren et al., 2007
Reverse	Bngen-R	TGGTACCGTTGCTTCATCATTT				
Sonda	Bngen-P	TTAATACCACCTTCAGGAAA				
Forward	Tuf1	GCTAAAACCTTGCCACGTTGTACG	144	<i>tuf</i>	16SrI	Wei et al., 2004
Reverse	Tuf2	CGGAAATAGAATTGAGGACGGT				
Sonda	Tuf-P	TGTTTTAACTAAAAGAAGGAGGAGC GTCACACTGCCTTTTCTCTC				

Table 6. Sequences and characteristics of oligonucleotides for primers and probes for quantitative PCR (qPCR). National Center of Phytosanitary Reference (CNRF), Mexico, 2017.

Aldagui et al. (2007), Angelini et al. (2007), Baric y Dalla-Via (2004), Bisognin et al. (2008), Christensen et al. (2004), Hren et al. (2007), Wei et al. (2004)

La qPCR también ha sido empleada para cuantificar la distribución y el flujo de los fitoplasmas en el floema de plantas afectadas, y reporta una infección desigual que depende del tipo y ciclo de vida de la planta huésped. Por ejemplo, en plantas leñosas se ha reportado una titulación baja con respecto a leguminosas (Galetto et al., 2005). Cabe señalar que, la qPCR es de gran utilidad en aquellos casos donde la concentración de fitoplasmas

es baja, debido a que es una técnica sensible que permite detectar un número pequeño de copias de ADN, en comparación con la PCR convencional.

El análisis cuantitativo proporcionado por la qPCR ha ayudado en la identificación de distintos fitoplasmas que convergen en una misma planta, aunque no se ha esclarecido si las plantas que albergan diferentes concentraciones de fitoplasmas se comportan de manera diferente como fuente de inóculo para los vectores (Saracco et al., 2006; Danet et al., 2011).

Amplificación isotérmica (LAMP)

La técnica LAMP (siglas de *Loop-mediated isothermal amplification*) utiliza una ADN polimerasa desplazante de cadena (Bst), junto con dos pares de oligonucleótidos, unos externos y otros internos, además de un par de oligos opcionales llamados “bucle” o “loop”, que reconocen diferentes secuencias del ADN blanco y generan distintos productos de amplificación (Dickinson, 2015). Es una técnica sensible que permite la identificación visual de los resultados mediante fluorescencia, turbidez o curvas de detección, sin necesidad de un programa térmico como en la PCR convencional o qPCR. En este caso, la reacción se lleva a cabo en un bloque térmico a una temperatura fija, debido a las propiedades de la enzima termoestable Bst (Francois et al., 2011).

La amplificación isotérmica ha sido implementada en la detección de distintos organismos fitopatógenos, entre ellos bacterias como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Yasuhara-Bell et al., 2015) y *Candidatus Liberibacter solanacearum* (Ravindran et al., 2012), virus como *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Fukata et al., 2003) y *Potato virus Y* (PVY) (Nie, 2005), nematodos como *Meloidogyne enterolobii* (Niu et al., 2012), entre otros.

En el caso de fitoplasmas, Hodgetts et al. (2011) reportaron la detección de distintos grupos (16SrI, 16SrII, 16SrIII, 16SrV, 16SrXI, 16SrXII y 16SrXXII), tomando los oligonucleótidos diseñados por Tomlinson et al. (2010) (Cuadro 7). Por otra parte, Obura et al. (2011) probaron la eficiencia y sensibilidad de la técnica al detectar los grupos de fitoplasmas 16SXI y 16SrIII con la amplificación isotérmica. El genoma publicado de “*Ca. Phytoplasma onion yellows*” (OY-M) (Oshima et al., 2004), fue utilizado por Sugawara et al. (2012) para el diseño de oligonucleótidos a partir del gen conservado *groEL*. La sensibilidad de la técnica, el espectro y la robustez de su estudio fueron probados a partir del diseño de diecinueve juegos de oligonucleótidos analizados en distintos grupos de fitoplasmas. Además, la técnica LAMP se propone como una herramienta para la detección del grupo 16SrV-C (*Flavescence dorée*), basada en la amplificación de la región 16SrRNA y la región 23SrRNA (Kogovšek et al., 2015) (Cuadro 7).

CUADRO 7

Secuencias y características de oligonucleótidos para la amplificación isotérmica (LAMP). Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria (CNRF), México, 2017.

Tipo	Nombre	Secuencia (5'-3')	Especificidad	Referencia
Externo	UNIF3	GAAGTCTGCAACTCGACTTC	Generales	Dickinson, 2015
Externo	UNIB3	CCTTAGAAAGGAGGTGATCC		
Interno	UNIFIP	ACGGGCGGTGTGTACAAACCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATC		
Interno	UNIBIP	GTCTAAGGTAGGGTCGATGCACCTCCGGTAGGGATAC		
Loop	UNIFL	CGAGAACGTATTACCCGCGAC		
Loop	UNIBL	GGGGTTAAGTCGTAACAAG	16SrI	Tomlinson et al., 2010
Externo	AYF3	TAATATTAAGGGCCTATAGATCAGTTGG		
Externo	AYB3	CACGGATCTTCACTTATTACAGCTT		
Interno	AYFIP	TATTTTGCCTATTGTGGTTATGGTTATAGAGTACACACCTAATAATTGTGAGG		
Interno	AYBIP	GAAGGTTAAAAAATCAAAGGAACCTAAGGGTTAATTGCGTCCTTCATCGG		
Loop	AYFL	CTAATGTGTAACTTGAACACCGA	16SrI	Dickinson, 2015
Loop	AYBL	ACAGTGGATGCCTTGGCACT		
Externo	SrIF3	TAATATTAAGGGCCTATAGCTCAGTTGG		
Externo	SrIB3	CACGGATCTTCACTTATTACAGCTT		
Interno	SrIFIP	ATTTTGCCTATTGTGGTTATGGTTATAGAGCACACGCTAATAAGCGTGAGG		
Interno	SrIBIP	GAAGGTTAAAAAATCAAAGGAACCTAAGGGTTAATTGCGTCCTTCATCGG	16SrII	Dickinson, 2015
Loop	SrIFL	CTAATGGACTTGAACACCGA		
Loop	SrIBL	ACAGTGGATGCCTTGGCACT		
Externo	SrIIF3	CCGAATGGGGCAACCTAC		
Externo	SrIIB3	CTCGTGTCTCGCGTACTT		
Interno	SrIIFIP	TTCTACAGTTACTTAGATATTTCAGTTATAAGTAGTTATAGTATCAATTGTTAGG	16SrII	Bekele et al., 2011
Interno	SrIIBIP	CTAGTTATCAAATTTAATTAACCTGATTTAATCTACCTCTACAGGATTTTCAC		
Loop	SrIIFL	CACTGCGTTCCTTTCAATC		
Loop	SrIIBL	AATAGTTGGAAAATATATCCTAGA		
Externo	SrIIF3	CCGAATGGGGCAACCTAC		
Externo	SrIIB3	CTCGTGTCTCGCGTACTT	16SrIII	Dickinson, 2015
Interno	SrIIFIP	TTCTACAGTTACTTAGATATTTCAGTTATAAGTAGTTATAGTATCAATTGTTAGG		
Interno	SrIIBIP	CTAGTTATCAAATTTAATTAACCTGATTTAATCTACCTCTACAGGATTTTCAC		
Loop	SrIIFL	CACTGCGTTCCTTTCAATC		
Loop	SrIIBL	AATAGTTGGAAAATATATCCTAGA		
Externo	SrIIF3	GGATACGCACTGAACCTGAA	16SrIV	Kogovšek et al., 2015
Externo	SrIIB3	GATTTCTCGTGTCTCGCC		
Interno	SrIIFIP	GTATCAGGCTCCTCCGATTGTAAGTGCAGGAAAAGAAAAGT		
Interno	SrIIBIP	AACCAACTTGAAAGTTTTTGGGAAAACGATACCCTAGATTTTAACTTACC		
Loop	SrIIFL	GTCRCTACTRCCAGAATCGTTATT		
Loop	SrIIBL	AACACCAAGAAAGGTGATAGTCC	16SrV	Dickinson, 2015
Externo	16S-F3	CGTGTCTGAGATGTTAGGTTAAG		
Loop	16S-FL	ACCATTACGTGCTGGCAACTAG		
Interno	16S-FIP	TATCCCCACCTTCCTCAATGTTAATTCTAAACGAACGCAACCCC		
Externo	16S-B3	CGCGATTACTAGCGATTCCAG		
Loop	16S-BL	GCTACAAACGTGATACAATGGCTA	16SrVI	Dickinson, 2015
Interno	16S-BIP	TCAAATCATCATGCCCTTATGATCTGGCAGACTTCAATCCGTAAGACTA		
Externo	SrXIF3	AAGAAGGAGGGCCTATAGCTCAGT		
Externo	SrXIB3	ATATCGCTGTTAATTACGTC		
Interno	SrXIFIP	AGAAAGATGACCTTTTTCAGTTGGTGTGGTTAGAGCACACGCTGATAAG		
Interno	SrXIBIP	CAAAGTAAATAATAAAATCAAAGGACATCGGCTCTTAGTGCCAAG	16SrVII	Dickinson, 2015
Loop	SrXIFL	ATGGACTTGAACCATCGACC		
Loop	SrXIBL	AAGGCGTACAGTGGATGC		
Externo	SrXIF3	GGATGCCTTGGCACTAAG		
Externo	SrXIB3	GTGTCTACGCCGTAATTC		
Interno	SrXIFIP	AACGGGTTGTCCCATTCGGCGATGAAGGACGCAATT	16SrVIII	Dickinson, 2015
Interno	SrXIBIP	TTCTGGTAGTAGTGACGAGCGATTACAGGACTGTACCTTCT		
Loop	SrXIFL	AATCCACGGATCTCACTTAT		
Loop	SrXIBL	CGGAAGAGCCTGATGCTATT		
Externo	SrXXIIF3	TAGAGGAAGGGCCTATAGCTCAGT		
Externo	SrXXIIB3	GTATCGCCGTTAATTGCGTC	16SrXXII	Dickinson, 2015
Interno	SrXXIIFIP	TGAATAAGAGGAATATGGTATGGGTGTGGTAGAGCACACGCTTGATAAG		
Interno	SrXXIIBIP	TCTCTAATGACACACCAATGAAGGACATCGGCTCTTAGTGCCAAG		
Loop	SrXXIIFL	GGACTTGAAACCATTGACCG		
Loop	SrXXIIBL	AAGGGCGTACAGTGGATGC		
Externo	CSPF3	TAGAGGAAGGGCCTATAGCTCAGT	16SrXXII	Tomlinson et al., 2010
Externo	CSPB3	GTATCGCCGTTAATTGCGTC		
Interno	CSPFIP	TGAATAAGAGGAATATGGTATGGGTGTGGTAGAGCACACGCTTGATAAG		
Interno	CSPBIP	TCTCTAATGACACACCAATGAAGGACATCGGCTCTTAGTGCCAAG		
Loop	CSPFL	GGACTTGAAACCATTGACCG		
Loop	CSPBL	AAGGGCGTACAGTGGATGC		

Table 7. Sequences and characteristics of oligonucleotides for Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers. Nacional Center of Phytosanitary Reference (CNRF), Mexico, 2017. Bekele et al. (2011), Dickinson (2015), Kogovšek et al. (2015), Tomlinson et al. (2010)

PCR- Digital de gotas (ddPCR)

La técnica PCR-Digital de gotas (ddPCR, por sus siglas en inglés Droplet Digital PCR) se basa en la cuantificación absoluta de moléculas de ADN con una alta sensibilidad. Esta técnica permite procesar hasta dos millones de reacciones de PCR en una misma prueba, debido a que cada muestra se divide en

aproximadamente 20 000 microgotas, las cuales son detectadas con sondas *TaqMan* (Hindson et al., 2011; Gutiérrez-Aguirre et al., 2015).

La ddPCR ha sido utilizada en diversos estudios como el análisis de mutaciones, estudios de genes y funciones específicas dentro de genomas, cuantificaciones absolutas, silenciamiento génico, entre otros (Pinheiro et al., 2012).

En el caso de los fitoplasmas, la sensibilidad de la técnica ha permitido el monitoreo de los efectores que segregan estos fitopatógenos al momento de modificar la permeabilidad de las células para invadirlas. En el trabajo publicado por Tan et al. (2016), se muestran las rutas metabólicas que siguen los efectores y el comportamiento de estos en la planta, empleando líneas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* para expresar el efector secretado SAP11 de "*Candidatus* Phytoplasma mali" [16SrX]. Se observó que en presencia de dicho efector, la planta presenta un fenotipo de aroma alterado, además de demostrar que SAP11 desestabiliza algunos factores de transcripción y el ácido jasmónico que genera *Nicotiana benthamiana* como respuesta a la infección del fitoplasma. Este hallazgo proporciona información valiosa para comprender cómo los efectores producidos por los fitoplasmas influyen en la planta. Por otra parte, Mehle et al. (2014) reportaron la cuantificación absoluta, mediante ddPCR, del fitoplasma que produce la enfermedad conocida como "*Flavescence dorée*" [16SrV].

La técnica ddPCR permite el uso de los oligonucleótidos y sonda diseñados para la qPCR. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que los equipos empleados en ddPCR no tienen el sistema óptico para realizar las lecturas en todas las longitudes de onda, por lo que, se recomienda marcar la sonda con un fluoróforo adecuado para el equipo a utilizar.

Otras técnicas de detección

Existen otras técnicas que pueden ser empleadas para la detección de fitoplasmas, entre ellas, los Ensayos de Movilidad Heterodúplex (HMA, por sus siglas en inglés de Heteroduplex Mobility Assay). Esta técnica ha permitido detectar las infecciones mixtas de fitoplasmas, así como la identificación y diferenciación genética de grupos estrechamente relacionados detectados en insectos vectores (Palmano y Firrao, 2000). Por otra parte, se han llevado a cabo ensayos mediante la técnica de Polimorfismo de la Longitud del Fragmento de Restricción Terminal (T-RFLP, por sus siglas en inglés de Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), la cual consiste en la digestión enzimática con endonucleasas de restricción a partir de productos de PCR marcados con un fluoróforo para regiones terminales del 16SrRNA. Esta técnica ha sido empleada para la identificación de fitoplasmas e inclusión en grupos filogenéticos (Hodgetts et al., 2007).

Otra técnica que ha sido utilizada para la identificación de fitoplasmas es la denominada Polimorfismo Conformacional de una Sola Cadena (SSCP, por sus siglas en inglés de *Single Strand Conformation Polymorphism*). En esta, los amplicones obtenidos por PCR convencional son sometidos a un proceso de desnaturalización con el fin de producir cadenas de ADN sencillas, que son separadas de acuerdo con su estructura primaria, mediante electroforesis y, finalmente, visualizadas en un gel de poliacrilamida (Nejat y Vadmalai, 2013). Esta técnica ha sido empleada para detectar mutaciones y conocer la variabilidad molecular de distintos fitoplasmas, mediante el uso de los genes 16SrRNA, *tuf*, *dnaB* y *hflB* (Musič et al., 2008).

CONCLUSIONES

La implementación de distintas técnicas moleculares basadas en la PCR ha permitido la detección, identificación y clasificación de los fitoplasmas, con el uso de oligonucleótidos diseñados a partir de distintas regiones y genes. Además, aún cuando no ha sido posible su aislamiento *in vitro*, se presentan las características generales de los genomas secuenciados de algunos fitoplasmas, por lo que, actualmente se tiene mayor conocimiento de su tamaño y composición.

El uso de la NGS y su posterior análisis bioinformático ha detallado el contexto genómico, donde es observable la pérdida de funciones metabólicas y de replicación celular autónoma; lo anterior sugiere una

evolución reductiva como consecuencia de su vida como parásito intracelular en un medio rico en nutrientes. La información obtenida de los genomas publicados amplía el panorama para una mejor comprensión de los mecanismos implicados en su patogenicidad, lo que podría permitir en un futuro su cultivo axénico.

LITERATURA CITADA

- Abou-Jawdah, Y., H. Dakhil, S. El-Mehtar, and I.M. Lee. 2003. Almond witches'-broom phytoplasma: a potential threat to almond, peach, and nectarine. *Can J. Plant Pathol.* 25:28-32.
- Ahrens, U., K.H. Lorenz, H. Kison, R. Berges, B. Schneider, and E. Seemüller. 1994. Universal, cluster-specific, and pathogen-specific PCR amplification of 16S rDNA for detection and identification of mycoplasma like organism. *IOM Letters* 3:250.
- Aldaghi, M., S. Massart, S. Roussel, and M.H. Jijakli. 2007. Development of a new probe for specific and sensitive detection of "*Candidatus* Phytoplasma mali" in inoculated apple trees. *Ann. Appl. Biol.* 2:251-258. doi:10.1111/j.1744-7348.2007.00171.x.
- Andersen, M.T., L.W. Liefing, I. Havukkala, and R.E. Beever. 2013. Comparison of the complete genome sequence of two closely related isolates of '*Candidatus* Phytoplasma australiense' reveals genome plasticity. *BMC Genomics* 14:529. doi:10.1186/1471-2164-14-529.
- Andersen, M.T., R.D. Newcomb, L.W. Liefing, and R.E. Beever. 2006. Phylogenetic analysis of "*Candidatus* Phytoplasma australiense" reveals distinct populations in New Zealand. *Phytopathology* 96:838-845. doi:10.1094/PHYTO-96-0838.
- Angelini, E., G.L. Bianchi, L. Filippin, C. Morassutti, and M. Borgo. 2007. A new TaqMan method for the identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows by real-time PCR assay. *J. Microbiol. Method.* 68:613-622. doi:10.1016/j.mimet.2006.11.015.
- Arnaud, G., S. Malembic-Maher, P. Salar, P. Bonnet, M. Maixner, C. Marcone, E. Boudon-Padieu, and X. Foissac. 2007. Multilocus sequences typing confirms the close genetic interrelatedness of three distinct Flavescence dorée infecting grapevine and alder in Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4001-4010. doi:10.1128/AEM.02323-06.
- Arya, A., I.S. Shergill, M. Williamson, L. Gommersall, N. Arya, and H.R. Patel. 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2:209-219. doi:10.1586/14737159.5.2.209.
- Azadvar, M., and V.K. Baranwal. 2010. Molecular characterization and phylogeny of a phytoplasma associated with phyllody disease of toria (*Brassica rapa* L. subsp. *dichotoma* (Roxb.)) in India. *Indian J. Virol.* 21:133-139. doi:10.1007/s13337-011-0023-6.
- Bai, X., J. Zhang, A. Ewing, A.S. Miller, A.J. Radek, D.V. Shevchenko, K. Tsukerman, T. Walunas, A. Lapidus, J.W. Campbell, and S.A. Hogenhout. 2006. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *J. Bacteriology* 188:3682-3696. doi:10.1128/JB.188.10.3682-3696.2006.
- Bai, X., J. Zhang, I.R. Holford, and S.A. Hogenhout. 2004. Comparative genomics identifies genes shared by distantly related insect-transmitted plant pathogenic mollicutes. *FEMS Microbiol. Lett.* 235:249-258. doi:10.1016/j.femsle.2004.04.043.
- Baric, S., and J. Dalla-Via. 2004. A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *J. Microbiol. Methods.* 57:135-145. doi:10.1016/j.mimet.2003.12.009.
- Bedendo, I.P., R.E. Davis, and E.L. Dally. 2000. Detection and identification of the maize bushy stunt phytoplasma in corn plants in Brazil using PCR and RFLP. *Int. J. Pest Manage.* 46:73-76. doi:10.1080/096708700227606.
- Bekele, B., J. Hodgetts, J. Tomlinson, N. Boonham, P. Nikolić, P. Swarbrick, and M. Dickinson. 2011. Use of a real-time LAMP isothermal assay for detecting 16SrII and XII phytoplasmas in fruit and weeds of the Ethiopian Rift Valley. *Plant Pathol.* 60:345-355. doi:10.1111/j.1365-3059.2010.02384.x.
- Benson, D.A., M. Cavanaugh, K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D.J. Lipman, J. Ostell, and E.W. Sayers. 2013. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 41:36-42. doi:10.1093/nar/gks1195.

- Bertaccini, A. 2007. Phytoplasmas: diversity, taxonomy and epidemiology. *Front. Biosci.* 12:673-689.
- Bertaccini, A., and B. Duduk. 2009. Phytoplasma and phytoplasma diseases: a review of recent research. *Phytopathol. Medit.* 48:355-378. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-3300.
- Bisognin, C., B. Schneider, H. Salm, M.S. Grando, W. Jarausch, E. Moll, and E. Seemüller. 2008. Apple proliferation resistance in apomictic rootstocks and its relationship to phytoplasma concentration and simple sequence repeat genotypes. *J. Bacteriol.* 98:153-158. doi:10.1094/PHYTO-98-2-0153.
- Chang, S.H., S.T. Cho, Ch.L. Chen, J.Y. Yang, and C.H. Kuo. 2015. Draft genome sequence of a 16SrII-A subgroup phytoplasma associated with purple coneflower (*Echinacea purpurea*) witches' broom disease in Taiwan. *Genome Announc.* 3(6):e01398-15. doi:10.1128/genomeA.01398-15.
- Chen, W., Y. Li, Q. Wang, N. Wang, and Y. Wu. 2014. Comparative genome analysis of wheat blue dwarf phytoplasma, an obligate pathogen that causes wheat blue dwarf disease in China. *PLoS ONE* 9(5):e96436. doi:10.1371/journal.pone.0096436.
- Christensen, M.N., M. Nicolaisen, M. Hansen, and A. Schulz. 2004. Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real-time PCR and bioimaging. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17:1175-1184. doi:10.1094/MPMI.2004.17.11.1175.
- Chung, W.C., L.L. Chen, W.S. Lo, C.P. Lin, and C.H. Kuo. 2013. Comparative analysis of the peanut witches' broom phytoplasma genome reveals horizontal transfer of potential mobile units and effectors. *PLoS ONE* 8(4):e62770. doi:10.1371/journal.pone.0062770.
- Cimerman, A., D. Pacifico, P. Salar, C. Marzachi, and X. Foissac. 2009. Striking diversity of vmp1, a variable gene encoding a putative membrane protein of the stolbur phytoplasma. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2951-2957. doi:10.1128/AEM.02613-08.
- Daire, X., D. Clair, J. Larrue, and E. Boudon-Padieu. 1997. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *Eur. J. Plant Pathol.* 103:507-514. doi:10.1023/A:1008641411025
- Danet, J.L., G. Balakishiyeva, A. Cimerman, N. Sauvion, V. Marie-Jeanne, G. Labonne, A. Laviña, A. Batlle, I. Križanac, D. Škorić, P. Ermacora, Ç.U. Serçe, K. Çağlayan, W. Jarausch, and X. Foissac. 2011. Multilocus sequences analysis reveals the genetic diversity of European fruit tree phytoplasmas and supports the existence of inter-species recombination. *Microbiology* 157:438-450. doi:10.1099/mic.0.043547-0.
- Deng, S., and C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J. Microbiol. Meth.* 14:53-61. doi:10.1016/0167-7012(91)90007-D.
- Dickinson, M. 2015. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for detection of phytoplasmas in the field. *Methods Mol. Biol.* 1302:99-111. doi:10.1007/978-1-4939-2620-6_8.
- Doi, Y., M. Teranaka, K. Yora, and H. Asuyama. 1967. Mycoplasma-or PLT group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom. *Japan. J. Phytopathol.* 33:259-266. doi:10.3186/jjphytopath.33.259.
- Fabre, A., J.L. Danet, and X. Foissac. 2011. The stolbur phytoplasma antigenic membrane protein gene stamp is submitted to diversifying positive selection. *Gene* 472:37-41. doi:10.1016/j.gene.2010.10.012.
- Fischer, A., I. Santana-Cruz, L. Wambua, C. Olds, C. Midega, M. Dickinson, P. Kawicha, Z. Khan, D. Masiga, J. Jores, and B. Schneider. 2016. Draft genome sequence of "Candidatus Phytoplasma oryzae" strain Mbita1, the causative agent of Napier Stunt disease in Kenya. *Genome Annunc.* 4(2):e00297-16. doi:10.1128/genomeA.00297-16.
- Foissac, X., and P. Carle. 2017. A draft genome of 'Candidatus Phytoplasma aurantifolia' the agent of the witches-broom disease of lime. NCBI, USA. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_MWKN01000002.1 (accessed Jul. 2017).
- Foissac, X., J.L. Danet, S. Malembic-Maher, P. Salar, D. Šafářová, P. Válová, and M. Navrátil. 2013. Tuf and secY PCR amplification and genotyping of phytoplasmas. *Methods Mol. Biol.* 938:189-204. doi:10.1007/978-1-62703-089-2_16.

- Francois, P., M. Tangomo, J. Hibbs, E.-J. Bonetti, C.C. Boehme, T. Notomi, M.D. Perkins, and J. Schrenzel. 2011. Robustness of a Loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 62:41-48. doi:10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x.
- Fukata, S., S. Kato, K. Yoshida, Y. Mizukami, A. Ishida, J. Ueda, M. Kanbe, and Y. Ishimoto. 2003. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction. *J. Virol. Methods.* 112:35-40. doi:10.1016/S0166-0934(03)00187-3.
- Galetto, L., D. Bosco, and C. Marzachi. 2005. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescentia doree (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors. *Ann. Appl. Biol.* 147:191-201. doi:10.1111/j.1744-7348.2005.00030.x.
- Gasparich, E.G. 2010. Spiroplasmas and phytoplasmas: Microbes associated with plant hosts. *Biologicals Rev.* 38:193-203. doi:10.1016/j.biologicals.2009.11.007.
- Gibb, K.S., A.C. Padovan, and B.D. Mogen. 1995. Studies on sweet potato little-leaf phytoplasma detected in sweet potato and other plant species growing in Northern Australia. *Mol. Plant. Pathol.* 85:169-174. doi:10.1094/Phyto-85-169.
- Gundersen, D.E., and I.M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopath. Medit.* 35:144-151.
- Gundersen, D.E., I.M. Lee, S.A. Rehner, R.E. Davis, and D.T. Kingsbury. 1994. Phylogeny of mycoplasma like organisms (Phytoplasmas): a basis for their classification. *J. Bacteriol.* 17:5244-5254.
- Gutiérrez-Aguirre, I., N. Rački, T. Dreo, and M. Ravnikar. 2015. Droplet digital PCR for absolute quantification of pathogens. *Methods Mol. Biol.* 302:331-347. doi:10.1007/978-1-4939-2620-6_24.
- Harrison, N.A., R.E. Davis, C. Oropeza, E.E. Helmick, M. Narváez, S. Eden-Green, M. Dollet, and M. Dickinson. 2014. '*Candidatus* Phytoplasma palmicola', associated with a lethal yellowing-type disease of coconut (*Cocos nucifera* L.) in Mozambique. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:1890-1899. doi:10.1099/ijs.0.060053-0.
- Harrison, N.A., M. Womack, and M.L. Carpio. 2002. Detection and characterization of a Lethal Yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Dis.* 86:676-681. doi:10.1094/PDIS.2002.86.6.676.
- Hindson, J.B., D.K. Ness, A.D. Masquelier, P. Belgrade, J.N. Heredia, J.A. Makarewicz, J.I. Bright, Y.M. Lucero, L.A. Hiddessen, C.T. Legler, K.T. Kitano, R.M. Hodel, F.J. Petersen, W.P. Wyatt, R.E. Steenblock, H.P. Shah, J.L. Bousse, B.C. Troup, C.J. Mellen, K.D. Wittmann, G.N. Erndt, H.T. Cauley, T.R. Koehler, P.A. So, S. Dube, A. K. Rose, L. Montesclaron, S. Wang, P.D. Stumbo, P.S. Hodges, S. Romine, P.F. Milanovich, E.H. White, F.J. Regan, G. Karlin-Neumann, M.C. Hinson, S. Saxonov, and W.B. Colston. 2011. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal. Chem.* 83:8604-8610. doi:10.1021/ac202028g.
- Hodgetts, J., T. Ball, N. Boonham, R. Mumford, and M. Dickinson. 2007. Use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants. *Plant. Pathol.* 56:357-365. doi:10.1111/j.1365-3059.2006.01561.x.
- Hodgetts, J., N. Boonham, R. Mumford, N. Harrison, and M. Dickinson. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of '*Candidatus* Phytoplasma'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:1826-1837. doi:10.1099/ijs.0.065668-0.
- Hodgetts, J., J. Tomlinson, N. Boonham, I. González-Marín, P. Nikolic, P. Swarbrick, E. N. Yankey, and M. Dickinson. 2011. Development of rapid in-field Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for phytoplasmas. *Bull. Insectol.* 64:S41-S42.
- Hogenhout, S.A., and M.Š. Music. 2010. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics: What have we learnt? In: P.G. Weintraub, and P.G. Jones, editors, *Phytoplasmas genomes, plant host and vectors*. CABI, Wallingford, GBR. p.19-36.
- Hren, M., J. Boben, A. Rotter, P. Kralj, K. Gruden, and M. Ravnikar. 2007. Real-time PCR detection systems for flavescentia doree and bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. *Plant Pathol.* 58:785-796. doi:10.1111/j.1365-3059.2007.01688.x.

- Ishii, T., Y. Doi, K. Yora, and H. Asuyama. 1967. Suppressive effects of antibiotics of tetracycline group on symptom development of mulberry dwarf disease. *Japan. J. Phytopathol.* 33:267-275. doi:10.3186/jjphytopath.33.267.
- Kakizawa, S., A. Makino, Y. Ishii, H. Tamaki, and Y. Kamagata. 2014. Draft genome sequence of “*Candidatus Phytoplasma asteris*” strain OY-V, an unculturable plant-pathogenic bacterium. *Genome Announc.* 2(5):e00944-14. doi:10.1128/genomeA.00944-14.
- Kakizawa, S., K. Oshima, H.Y. Jung, S. Suzuki, H. Nishigawa, R. Arashida, S.I. Miyata, M. Ugaki, H. Kishino, and S. Namba. 2006a. Positive selection acting on a surface membrane protein of the plant-pathogenic phytoplasmas. *J. Bacteriol.* 188:3424-3428. doi:10.1128/JB.188.9.3424-3428.2006.
- Kakizawa, S., K. Oshima, and S. Namba. 2006b. Diversity and functional importance of phytoplasma membrane proteins. *Trends Microbiol.* 14:254-256. doi:10.1016/j.tim.2006.04.008.
- Kogovšek, P., J. Hodgetts, J. Hall, N. Prezelj, P. Nikolić, N. Mahle, R. Lenarčič, A. Rotter, M. Dickinson, N. Boonham, M. Dermastia, and M. Ravnikar. 2015. LAMP assay and rapid sample preparation method for on-site detection of flavescence doreé phytoplasma in grapevine. *Plant. Pathol.* 64:286-296. doi:10.1111/ppa.12266.
- Kollar, A., and E. Seemüller. 1989. Base composition of the DNA of mycoplasma-like organisms associated with various plant diseases. *J. Plant Pathol.* 127:177-186. doi:10.1111/j.1439-0434.1989.tb01127.x.
- Kube, M., B. Schneide, H. Kuhl, T. Dandekar, K. Heitmann, A.M. Migdoll, R. Reinhardt, and E. Seemüller. 2008. The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’. *BMC Genomics* 9:306. doi:10.1186/1471-2164-9-306.
- Lee, I.M., A. Bertaccini, M. Vibio, and D.E. Gundersen. 1995. Detection of multiple phytoplasma in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85:728-735. doi:10.1094/Phyto-85-728.
- Lee, I.M., K.D. Bottner-Parker, Y. Zhao, R.E. Davis, and N.A. Harrison. 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. *IJSEMI* 60:2887-2897. doi:10.1099/ij.s.0.019695-0.
- Lee, I.M., R.E. Davis, and D.E. Gundersen-Rindal. 2000. Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:221-255. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.221.
- Lee, I.M., E. Dawn, E. Gundersen-Rindal, and A. Bertaccini. 1998a. Phytoplasma: Ecology and genomic diversity. *Phytopathology* 88:1359-1366. doi:10.1094/PHYTO.1998.88.12.1359.
- Lee, I.M., E. Dawn, E. Gundersen-Rindal, R.E. Davis, and I.M. Bartoszyk. 1998b. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:1153-1169.
- Lee, I.M., D.E. Gundersen, R.W. Hammond, and R.E. Davis. 1994. Use of mycoplasma organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect Mixed-MLO infections in a single host plant. *Mol. Plant Pathol.* 84:559-566. doi:10.1094/Phyto-84-559.
- Lee, I.M., D.E. Gundersen-Rindal, R.E. Davis, K.D. Bottner, C. Marcone, and E. Seemüller. 2004a. ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1037-1048. doi: 10.1099/ij.s.0.02843-0.
- Lee, I.M., R.W. Hammond, R.E. Davis, and D.E. Gundersen. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16SrDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Mol. Plant Pathol.* 83:834-842.
- Lee, I.M., M. Martini, C. Marcone, and S.F. Zhu. 2004b. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:337-47. doi:10.1099/ij.s.0.02697-0.
- Lee, I.M., J. Shao, K.D. Bottner-Parker, D. E. Gundersen-Rindal, Y. Zhao, and R.E. Davis. 2015. Draft genome sequence of “*Candidatus Phytoplasma pruni*” strain CX, a plant-pathogenic bacterium. *Genome Announc.* 3(5):e01117-15. doi:10.1128/genomeA.01117-15.
- Lee, I.M., Y. Zhao, and K.D. Bottner. 2006. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. *Mol. Cell. Probes.* 20: 87-91. doi:10.1016/j.mcp.2005.10.001.
- Lim, O.P., and B.B. Sears. 1992. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences. *J. Bacteriol.* 8:2606-2611.

- Lorenz, K.H., B. Schneider, U. Ahrens, and E. Seemüller. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA. *Phytopathology* 85:771-776. doi:10.1094/Phyto-85-771.
- Makarova, O., N. Contaldo, S. Paltrinieri, A. Bertaccini, H. Nyskjold, and M. Nicolaisen. 2013. DNA bar-coding for phytoplasma identification. *Methods Mol. Biol.* 938:301-17. doi:10.1007/978-1-62703-089-2_26.
- Malembic-Maher, S., F. Constable, A. Cimerman, G. Arnaud, P. Carle, X. Foissac, and E. Boudon-Padieu. 2008. A chromosome map of the Flavescence dorée phytoplasma. *Microbiology* 154:1454-1463. doi:10.1099/mic.0.2007/013888-0.
- Marcone, C., I.M. Lee, R.E. Davis, A. Ragozzino, and E. Seemüller. 2000. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1703-1713. doi:10.1099/00207713-50-5-1703.
- Marcone, C., H. Neimark, A. Ragozzino, U. Laurer, and E. Seemüller. 1999. Chromosome size of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89:805-810. doi:10.1094/PHYTO.1999.89.9.805
- Martini, M., I.M. Lee, K.D. Bottner, Y. Zhao, S. Botti, A. Bertaccini, N.A. Harrison, L. Carraro, C. Marcone, A.J. Khan, and R. Osler. 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2037-2051. doi:10.1099/ijs.0.65013-0.
- Mehle, N., T. Dreö, and M. Ravnikar. 2014. Quantitative analysis of “flavescence dorée” phytoplasma with droplet digital PCR. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 4:9-15. doi:10.5958/2249-4677.2014.00576.3.
- Mitrović, J., S. Kakizawa, B. Duduk, K. Oshima, S. Namba, and A. Bertaccini. 2011. The groEL gene as an additional marker for finer differentiation of “*Candidatus* Phytoplasma asteris” – related strains. *Ann. Appl. Biol.* 159:41-48. doi:10.1111/j.1744-7348.2011.00472.x.
- Mitrović, J., C. Siewert, B. Duduk, J. Hecht, K. Mölling, F. Broecker, P. Beyerlein, C. Büttner, A. Bertaccini, and M. Kube. 2014. Generation and analysis of draft sequences of ‘stolbur’ phytoplasma from multiple displacement amplification templates. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 24:1-11. doi:10.1159/000353904.
- Mpunami, A.A., A. Tymon, P. Jones, and M.J. Dickinson. 1999. Genetic diversity in the coconut lethal yellowing disease phytoplasmas of East Africa. *Plant Pathol.* 48:109-114. doi:10.1046/j.1365-3059.1999.00314.x.
- Musić, Š.M., M. Krajačić, and D. Škorić. 2008. The use of SSCP analysis in the assessment of phytoplasma gene variability. *J. Microbiol. Meth.* 73:69-72. doi:10.1016/j.mimet.2008.02.003.
- Namba, S., S. Kato, S. Iwanami, H. Oyaizu, H. Shiozawa, and T. Tsuchizaki. 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using Polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* 83:786-791. doi:10.1094/Phyto-83-786.
- Neimark, H., and B.C. Kirkpatrick. 1993. Isolation and characterization of full-length chromosomes from non-culturable plant-pathogenic Mycoplasma-like organisms. *Mol. Microbiol.* 7:21-8. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01093.x.
- Nejat, N., and G. Vadmalai. 2013. Diagnostic techniques for detection of phytoplasma diseases: past and present. *J. Plant Dis. Protect.* 120:16-25. doi:10.1007/BF03356449.
- Nie, X. 2005. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y. *Plant Dis.* 89:605-610. doi:10.1094/PD-89-0605.
- Niu, J.H., H. Juan, Q.X. Guo, C.L. Chen, X.Y. Wang, Q. Liu, and Y.D. Guo. 2012. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii*. *Plant Pathol.* 61:809-819. doi:10.1111/j.1365-3059.2011.02562.x.
- Obura, E., D. Masiga, F. Wachira, B. Gurja, and R.Z. Kha. 2011. Detection of phytoplasma by loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP). *J. Microbiol. Meth.* 84:312-16. doi:10.1016/j.mimet.2010.12.011.
- Orlovskis, Z., M.C. Canale, M. Haryono, J.R.S. Lopes, C.H. Kuo, and S.A. Hogenhout. 2016. Complete genome sequence of maize bushy stunt phytoplasma M3. Institute of Plant and Microbial Biology, Academia Sinica, 128 Sec. 2, Academia Rd, Taipei 11529, Taiwan. NCBI, USA. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/ (consultado en jun. 2017).

- Oshima, K., S. Kakizawa, H. Nishigawa, H.Y. Jung, W. Wei, S. Suzuki, R. Arashida, D. Nakata, S. Miyata, M. Ugaki, and S. Namba. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Gen.* 36:27-29. doi:10.1038/ng1277.
- Oshima, K., S.I. Miyata, T. Sawayanagi, S. Kakizawa, H. Nishigawa, H.Y. Jung, K.I. Furuki, M. Yanazaki, S. Suzuki, W. Wei, T. Kuboyama, M. Ugaki, and S. Namba. 2002. Minimal set of metabolic pathways suggested from the genome of Onion Yellows Phytoplasma. *J. Gen. Plant. Pathol.* 68:225-236. doi:10.1007/PL00013081.
- Pacifico, D., L. Galetto, M. Rashidi, S. Abbà, S. Palmano, G. Firrao, D. Bosco, and C. Marzachi. 2015. Decreasing global transcript levels over time suggest that phytoplasma cells enter stationary phase during plant and insect colonization. *Appl. Environ. Microbiol.* 81:2591-2602. doi:10.1128/AEM.03096-14.
- Padovan, A.C., K.S. Gibb, A. Bertaccini, M. Vibio, R.E. Bonfigliolo, P.A. Magarey, and B.B. Sears. 1995. Molecular detection of the Australian grapevine yellows phytoplasma and comparison with grapevine yellows phytoplasma from Italy. *Austr. J. Grape Wine Res.* 1:25-31. doi:10.1111/j.1755-0238.1995.tb00074.x.
- Palmano, S., and G. Firrao. 2000. Diversity of phytoplasmas isolated from insects, determined by a DNA heteroduplex mobility assay and a length polymorphism of the 16S y 23S rDNA spacer region analysis. *J. Appl. Microbiol.* 89:744-750. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.01172.x
- Pérez-López, E., D. Rodríguez-Marínez, C.Y. Olivier, M. Luna-Rodríguez, and T.J. Dumonceaux. 2017. Molecular diagnostic assays based on cpn60 UT sequences reveal the geographic distribution of subgroup 16SrXII-(A/I)I phytoplasma in Mexico. *Sci. Rep.* 7:1-14. doi:10.1038/s41598-017-00895-1.
- Pinheiro, B.L., A.V. Coleman, M.C. Hidson, J. Herrmann, J.B. Hindson, S. Bhat, and R.K. Emslie. 2012. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal. Chem.* 84:1003-1011. doi:10.1021/ac202578x.
- Quaglino, F., M. Kube, Y. Abou-Jawdah, C. Siewert, E. Choueire, H. Sobh, P. Casati, R. Tedeschi, M.M. Lova, A. Alma, and A.P. Bianco. 2015. 'Candidatus Phytoplasma phoenicium' associated with almond witches'-broom disease: from draft genome to genetic diversity among strain populations. *BMC Microbiol.* 15:148. doi:10.1186/s12866-015-0487-4.
- Ravindran, A., J. Levy, E. Pierson, and D.C. Gross. 2012. Development of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Procedure as a sensitive and rapid method for detection of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' in potatoes and psyllids. *Phytopathology* 112:899-907. doi:10.1094/PHYTO-03-12-0055-R.
- Razin, S., D. Yogeve, and Y. Naot. 1998. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:1094-1156.
- Revels-Torres, L.R., R. Velásquez-Valle, y J.A. Mauricio-Castillo. 2014. Fitoplasmas: otros agentes fitopatógenos. Folleto Técnico No. 56. INIFAP, México D.F., MEX.
- Saccardo, F., M. Martini, S. Palmano, P. Ermacora, M. Scortichini, N. Loi, and G. Firrao. 2012. Genome drafts of four phytoplasma strains of the ribosomal group 16SrIII. *Microbiology* 158:2805-2814. doi:10.1099/mic.0.061432-0.
- Saracco, P., D. Bosco, F. Veratti, and C. Marzachi. 2006. Quantification over time of chrysanthemum yellows phytoplasma (16Sr-I) in leaves and roots of the host plant *Chrysanthemum carinatum* (Schousboe) following inoculation with its insects vector. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67:212-219. doi:10.1016/j.pmpp.2006.02.001.
- Schneider, B., K.S. Gibb, and E. Seemüller. 1997. Sequences and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143:3381-3389. doi:10.1099/00221287-143-10-3381.
- Schneider, B., E. Seemüller, C.D. Smart, and B.C. Kirkpatrick. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: S. Razin, and J.G. Tully, editors, *Molecular microbial and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Academic press, CA, USA. p. 369-380.
- Seemüller, E., M. Garnier, and B. Schneider. 2002. Mycoplasmas of plants and insects. In: S. Razin, and R. Herrmann, editors, *Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas*. Springer, Boston, MA, USA. p. 91-115.

- Seemüller, E., and B. Schneider. 2007. Differences in virulence and genomic features of strains of 'Candidatus phytoplasma mali', the apple proliferation agent. *Phytopathology* 97:964-970. doi:10.1094/PHYTO-97-8-0964.
- Smart, C.D., B. Schneider, C.L. Blomquist, L.J. Guerra, N.A. Harrison, U. Ahrens, K.H. Lorenz, E. Seemüller, and B.C. Kirkpatrick. 1996. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2988-2993.
- Sugawara, K., M. Himeno, T. Keima, Y. Kitazawa, K. Maejima, K. Oshima, and S. Namba. 2012. Rapid and reliable detection of phytoplasma by loop-mediated isothermal amplification targeting a housekeeping gene. *J. Gen. Plant Pathol.* 78:389-397. doi:10.1007/s10327-012-0403-9.
- Tan, M.C., H.C. Li, W.N. Tsao, W.L. Su, T.Y. Lu, H.S. Chang, Y.Y. Lin, C.J. Liou, C.L. Hsish, Z.J. Yu, R.C. Sheue, Y.S. Wang, F.C. Lee, and Y.J. Yang. 2016. Phytoplasma SAP11 alters 3-isobutyl-2-methoxypyrazine biosynthesis in *Nicotina benthamiana* by suppressing NbOMT1. *J. Exp. Bot.* 67:1-11. doi:10.1093/jxb/erw225.
- The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group. 2004. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1243-1255. doi:10.1099/ijs.0.02854-0.
- Tomlinson, J., N. Boonham, and M. Dickinson. 2010. Development and evaluation of a one-hour DNA extraction and loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of phytoplasmas. *Plant Pathol.* 59:465-471. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02233.x.
- Torres, E., E. Bertolini, M. Cambra, C. Montón, and P.M. Martín. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from apple proliferation (16SrX) group. *Mol. Cell. Probes.* 19:334-340. doi:10.1016/j.mcp.2005.06.002.
- Tran-Nguyen, L.T.T., M. Kube, B. Schneider, R. Reinhardt, and K.S. Gibb. 2008. Comparative genome analysis of "Candidatus Phytoplasma australiense" (Subgroup tuf-Australia I; rp-A) and "Ca. Phytoplasma asteris" strains OY-M and AY-WB. *J. Bacteriol.* 190:3979-3991. doi:10.1128/JB.01301-07.
- Wei, W., E.R. Davis, M.I. Lee, and Y. Zhao. 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1855-1867. doi:10.1099/ijs.0.65000-0.
- Wei, W., S. Kakizawa, S. Suzuki, H.Y. Jung, H. Nishigawa, S.I. Miyata, K. Oshima, M. Ugaki, T. Hibi, and S. Namba. 2004. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. *Phytopathology* 94:244-250. doi:10.1094/PHYTO.2004.94.3.244.
- Yasuhara-Bell, J., F. Baysal-Gurel, S.A. Miller, and A.M. Alvarez. 2015. Utility of a loop-mediated amplification assay for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in seeds and plant tissues. *Can. J. Plant Pathol.* 37:260-266. doi:10.1080/07060661.2015.1053988.
- Zamorano, A., and N. Fiore. 2016. Draft genome of 16SrIII-J phytoplasma, a plant pathogenic bacterium with a broad spectrum of hosts. *Genome Announc.* 4(3):e00602-16. doi:10.1128/genomeA.00602-16.
- Zhao, Y., W. Wei, I.M. Lee, J. Shao, X. Sou, and R.E. Davis. 2009. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:2582-2593. doi:10.1099/ijs.0.010249-0.
- Zhu, Y., Y. He, Z. Zheng, J. Chen, Z. Wang, and G. Zhou. 2017. Draft genome sequence of Rice Orange Leaf Phytoplasma from Guangdong, China. *Genome Announc.* 5(22):e00430-17. doi:10.1128/genomeA.00430-17.

NOTAS

- 1 Este trabajo formó parte de las actividades de referencia fitosanitaria, desarrolladas por el Área de Desarrollo y Validación de Protocolos del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México.

ENLACE ALTERNATIVO

<http://www.revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso> (html)